

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/NL 00/00597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROMANO C P ET AL: "INACTIVATION OF AUXIN IN TOBACCO TRANSFORMED WITH THE IAA-LYSINE SYNTHETASE GENE OF PSEUDOMONAS-SAVASTANOI" GENES & DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1991, pages 438-446, XP000997164 ISSN: 0890-9369 see also abstract, page 442, page 444, last paragraph page 440, right-hand column; figure 4 ---	
A	WO 99 06579 A (INSTITUUT VOOR AGROBIOLOGISCH ;KOK CORNELIS JOHANNES (NL); KRIEKEN) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application the whole document --- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 2001

Date of mailing of the international search report

09/04/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/NL 00/00597

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89 09262 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 5 October 1989 (1989-10-05) page 18 -page 19 ----	
A	MIROSLAV KAMINEK: "PROGRESS IN CYTOKININ RESEARCH" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 10, no. 5, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 159-164, XP000272384 ISSN: 0167-7799 ----	
A	WO 99 06571 A (UNIV MISSOURI) 11 February 1999 (1999-02-11) the whole document ----	
A	WO 98 00545 A (INST OF ARABLE CROPS RESEARCH ;HOOLEY RICHARD (GB); PLAKIDOU DYMOC) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document ----	
A	KAKIMOTO T: "CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 274, 8 November 1996 (1996-11-08), pages 982-985, XP002102276 ISSN: 0036-8075 the whole document ----	
A	DE KLERK GEERT-JAN ET AL: "Review: The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY PLANT, vol. 35, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 189-199, XP000992525 ISSN: 1054-5476 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. tional Application No

PCT/NL 00/00597

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906579	A	11-02-1999	AU 8651298 A EP 1003892 A	22-02-1999 31-05-2000
WO 8909262	A	05-10-1989	DE 3810286 A AT 132188 T AU 633484 B AU 3358989 A BR 8906478 A DE 68925258 D DE 68925258 T DK 594389 A EP 0334383 A EP 0362349 A ES 2083391 T GR 3019435 T HU 52159 A ZA 8902206 A	12-10-1989 15-01-1996 04-02-1993 16-10-1989 27-11-1990 08-02-1996 15-05-1996 24-11-1989 27-09-1989 11-04-1990 16-04-1996 30-06-1996 28-06-1990 29-11-1989
WO 9906571	A	11-02-1999	AU 8603898 A BR 9811592 A CN 1265146 T EP 1002096 A PL 338330 A HU 0002349 A	22-02-1999 19-09-2000 30-08-2000 24-05-2000 23-10-2000 28-11-2000
WO 9800545	A	08-01-1998	AU 3351997 A CA 2258694 A EP 0918862 A JP 2000513937 T	21-01-1998 08-01-1998 02-06-1999 24-10-2000

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference L/XQ69/ems/5	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/NL 00/ 00597	International filing date (day/month/year) 28/08/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/08/1999
Applicant PLANT RESEARCH INTERNATIONAL et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A ✓	ROMANO C P ET AL: "INACTIVATION OF AUXIN IN TOBACCO TRANSFORMED WITH THE IAA-LYSINE SYNTHETASE GENE OF PSEUDOMONAS-SAVASTANOI" GENES & DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1991, pages 438-446, XP000997164 ISSN: 0890-9369 see also abstract, page 442, page 444, last paragraph page 440, right-hand column; figure 4	
A ✓	WO 99 06579 A (INSTITUUT VOOR AGROBIOLOGISCH ;KOK CORNELIS JOHANNES (NL); KRIEKEN) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application the whole document --- --/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 2001

Date of mailing of the international search report

09/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>✓ WO 89 09262 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 5 October 1989 (1989-10-05) page 18 -page 19</p> <p>---</p>	
A	<p>✓ MIROSLAV KAMINEK: "PROGRESS IN CYTOKININ RESEARCH" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 10, no. 5, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 159-164, XP000272384 ISSN: 0167-7799</p> <p>---</p>	
A	<p>✓ WO 99 06571 A (UNIV MISSOURI) 11 February 1999 (1999-02-11) the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>✓ WO 98 00545 A (INST OF ARABLE CROPS RESEARCH ;HOOLEY RICHARD (GB); PLAKIDOU DYMOC) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>✓ KAKIMOTO T: "CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 274, 8 November 1996 (1996-11-08), pages 982-985, XP002102276 ISSN: 0036-8075 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>✓ DE KLERK GEERT-JAN ET AL: "Review: The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY PLANT, vol. 35, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 189-199, XP000992525 ISSN: 1054-5476 the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/00597

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906579	A	11-02-1999	AU 8651298 A	22-02-1999
			EP 1003892 A	31-05-2000
WO 8909262	A	05-10-1989	DE 3810286 A	12-10-1989
			AT 132188 T	15-01-1996
			AU 633484 B	04-02-1993
			AU 3358989 A	16-10-1989
			BR 8906478 A	27-11-1990
			DE 68925258 D	08-02-1996
			DE 68925258 T	15-05-1996
			DK 594389 A	24-11-1989
			EP 0334383 A	27-09-1989
			EP 0362349 A	11-04-1990
			ES 2083391 T	16-04-1996
			GR 3019435 T	30-06-1996
			HU 52159 A	28-06-1990
			ZA 8902206 A	29-11-1989
WO 9906571	A	11-02-1999	AU 8603898 A	22-02-1999
			BR 9811592 A	19-09-2000
			CN 1265146 T	30-08-2000
			EP 1002096 A	24-05-2000
			PL 338330 A	23-10-2000
			HU 0002349 A	28-11-2000
WO 9800545	A	08-01-1998	AU 3351997 A	21-01-1998
			CA 2258694 A	08-01-1998
			EP 0918862 A	02-06-1999
			JP 2000513937 T	24-10-2000

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/18170 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N (74) Agent: VAN SOMEREN, Petronella, Francisca, Hendrika, Maria; Arnold & Siedsma, Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).
- (21) International Application Number: PCT/NL00/00597
- (22) International Filing Date: 28 August 2000 (28.08.2000) (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: Dutch
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
1012917 26 August 1999 (26.08.1999) NL (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V. [NL/NL]; Droevendaalsesteeg 1, NL-6708 PB Wageningen (NL).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): VAN DER KRIEKEN, Wilhelmus, Maria [NL/NL]; Laantje van Anton Pieck 2, NL-6708 RE Wageningen (NL). VAN LOOKEREN CAMPAGNE, Michiel, Maria [BE/BE]; Lievestraat 31, B-9920 Lovendegem (BE). KODDE, Jan [NL/NL]; Van Doesburglaan 28, NL-6708 MC Wageningen (NL).

Published:

— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/18170 A2

(54) Title: CONDITIONAL INHIBITION OF VEGETATIVE PROPAGATION

(57) Abstract: The invention relates to a method for enabling rooting or grafting of a plant which contains in its genome a gene which is placed under the regulation of an inducible promoter and which codes for a rooting-inhibiting product or a product leading to rooting inhibition, comprising of treating the plant prior to production of a cutting or graft or treating the cutting or graft after production of the cutting or graft with a substance which either discontinues the effect of the rooting-inhibiting gene; and/or results in expression of a second gene likewise present in the plant which is under the regulation of an inducible promoter and the expression product of which discontinues the effect of the rooting-inhibiting gene. The invention further relates to a transgenic plant which is provided with a mechanism for rooting inhibition and a mechanism which discontinues rooting inhibition, and to a DNA construct for effecting the discontinuation of rooting inhibition.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/18170 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/82
- (21) International Application Number: PCT/NL00/00597
- (22) International Filing Date: 28 August 2000 (28.08.2000)
- (25) Filing Language: Dutch
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
1012917 26 August 1999 (26.08.1999) NL
- (71) Applicant (for all designated States except US): PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V. [NL/NL]; Droevendaalsesteeg 1, NL-6708 PB Wageningen (NL).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER KRIEKEN, Wilhelmus, Maria [NL/NL]; Laantje van Anton Pieck 2, NL-6708 RE Wageningen (NL). VAN LOOKEREN CAMPAGNE, Michiel, Maria [BE/BE]; Lievestraat 31, B-9920 Lovendegem (BE). KODDE, Jan [NL/NL]; Van Doesburglaan 28, NL-6708 MC Wageningen (NL).
- (74) Agent: VAN SOMEREN, Petronella, Francisca, Hendrika, Maria; Arnold & Siedsma, Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
20 September 2001
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONDITIONAL INHIBITION OF VEGETATIVE PROPAGATION

(57) Abstract: The invention relates to a method for enabling rooting or grafting of a plant which contains in its genome a gene which is placed under the regulation of an inducible promoter and which codes for a rooting-inhibiting product or a product leading to rooting inhibition, comprising of treating the plant prior to production of a cutting or graft or treating the cutting or graft after production of the cutting or graft with a substance which either discontinues the effect of the rooting-inhibiting gene; and/or results in expression of a second gene likewise present in the plant which is under the regulation of an inducible promoter and the expression product of which discontinues the effect of the rooting-inhibiting gene. The invention further relates to a transgenic plant which is provided with a mechanism for rooting inhibition and a mechanism which discontinues rooting inhibition, and to a DNA construct for effecting the discontinuation of rooting inhibition.

WO 01/18170 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int Application No

PCT/NL 00/00597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROMANO C P ET AL: "INACTIVATION OF AUXIN IN TOBACCO TRANSFORMED WITH THE IAA-LYSINE SYNTHETASE GENE OF PSEUDOMONAS-SAVASTANOI" GENES & DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1991, pages 438-446, XP000997164 ISSN: 0890-9369 see also abstract, page 442, page 444, last paragraph page 440, right-hand column; figure 4 ---	
A	WO 99 06579 A (INSTITUUT VOOR AGROBIOLOGISCH ;KOK CORNELIS JOHANNES (NL); KRIEKEN) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application the whole document --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 2001

Date of mailing of the international search report

09/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/NL 00/00597

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89 09262 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 5 October 1989 (1989-10-05) page 18 -page 19 ---	
A	MIROSLAV KAMINEK: "PROGRESS IN CYTOKININ RESEARCH" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 10, no. 5, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 159-164, XP000272384 ISSN: 0167-7799 ---	
A	WO 99 06571 A (UNIV MISSOURI) 11 February 1999 (1999-02-11) the whole document ---	
A	WO 98 00545 A (INST OF ARABLE CROPS RESEARCH ;HOOLEY RICHARD (GB); PLAKIDOU DYMOG) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document ---	
A	KAKIMOTO T: "CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 274, 8 November 1996 (1996-11-08), pages 982-985, XP002102276 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	
A	DE KLERK GEERT-JAN ET AL: "Review: The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY PLANT, vol. 35, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 189-199, XP000992525 ISSN: 1054-5476 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. Application No

PCT/NL 00/00597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906579 A	11-02-1999	AU 8651298 A EP 1003892 A	22-02-1999 31-05-2000
WO 8909262 A	05-10-1989	DE 3810286 A AT 132188 T AU 633484 B AU 3358989 A BR 8906478 A DE 68925258 D DE 68925258 T DK 594389 A EP 0334383 A EP 0362349 A ES 2083391 T GR 3019435 T HU 52159 A ZA 8902206 A	12-10-1989 15-01-1996 04-02-1993 16-10-1989 27-11-1990 08-02-1996 15-05-1996 24-11-1989 27-09-1989 11-04-1990 16-04-1996 30-06-1996 28-06-1990 29-11-1989
WO 9906571 A	11-02-1999	AU 8603898 A BR 9811592 A CN 1265146 T EP 1002096 A PL 338330 A HU 0002349 A	22-02-1999 19-09-2000 30-08-2000 24-05-2000 23-10-2000 28-11-2000
WO 9800545 A	08-01-1998	AU 3351997 A CA 2258694 A EP 0918862 A JP 2000513937 T	21-01-1998 08-01-1998 02-06-1999 24-10-2000

P ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 24 May 2001 (24.05.01)	Applicant's or agent's file reference L/XQ69/ems/5
International application No. PCT/NL00/00597	Priority date (day/month/year) 26 August 1999 (26.08.99)
International filing date (day/month/year) 28 August 2000 (28.08.00)	
Applicant VAN DER KRIEKEN, Wilhelmus, Maria et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 23 March 2001 (23.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not


made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zakaria EL KHODARY
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference L/XQ69/ems/5		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL00/00597	International filing date (day/month/year) 28/08/2000	Priority date (day/month/year) 26/08/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/82			
Applicant PLANT RESEARCH INTERNATIONAL et al.			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 2 sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application 			
Date of submission of the demand 23/03/2001		Date of completion of this report 02.01.2002	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Hoff, C Telephone No. +49 89 2399 7895	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL00/00597

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-18 as originally filed

Claims, No.:

1-3,6-32 as originally filed

4,5 as received on 07/11/2001 with letter of 07/11/2001

Drawings, sheets:

1/1 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL00/00597

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims 1-32
	No:	Claims
Inventive step (IS)	Yes:	Claims
	No:	Claims 1-32
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims 1-32
	No:	Claims

- 2. Citations and explanations**
see separate sheet

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 99 06579 A (INSTITUUT VOOR AGROBIOLOGISCH ;KOK CORNELIS JOHANNES (NL); KRIEKEN) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application
- D2: MIROSLAV KAMINEK: 'PROGRESS IN CYTOKININ RESEARCH' TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 10, no. 5, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 159-164, XP000272384 ISSN: 0167-7799
- D3: WO 89 09262 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 5 October 1989 (1989-10-05)

V.1) Novelty

The present application meets the requirements of Article 33(2) PCT, the subject-matter of claims 1-32 is new over the prior art documents cited in the search report.

D3 discloses a transgenic plant with modified physiology and hormone metabolism containing the coding region of IPT of *Agrobacterium tumefaciens* and one or more *rolABC* genes. These genes are under the control of their natural or a heterologous strong constitutive promoter (abstract).

V.2) Inventive step

D3 does not represent the closest prior art because the subject matter disclosed in the document does not belong to the same technical field. D3 doesn't relate to conditional root inhibition, instead it is related to the use of *rolA*, *rolB* and *rolC* gene for the improvement of rooting (p.3, l. 1-3 and l.28-29; p.4, l.11-17).

The closest prior art is thus represented by D1.

D1 discloses a method for inhibiting the unwanted action of a hormone in plants in order to inhibit for example root formation (p.1, l.1-8).

The method comprises the steps of (claim 25):

- a) transforming a plant cell with a DNA construct, comprising a gene or the genes encoding an enzyme that is involved in the keystone or the keysteps in the pathway

that leads to the synthesis of a hormone antagonist, which gene is under the control of a promoter, which is specifically induced by the unwanted action of the plant hormone.

b) regenerating a transgenic plant hormone.

Claim 26 of D1 further precises that the gene mentioned in claim 25 is the ipt gene.

In contrast to the closest prior art, the present application also discloses a way to restore the rooting and grafting capabilities of such transgenic plants.

The problem to be solved in the present application consists in **restoring the rooting and grafting capabilities of such transgenic plants.**

The solution as disclosed by claim 1 consists in further treating the plant with a substance which discontinues the effect of the rooting inhibiting gene and/or results in expression of a second gene likewise present in the plant which is under the regulation of an inducible promoter and the expression of which discontinues the effect of the rooting-inhibiting gene.

D2 teaches that the reduction of cytokinin content relative to auxin content in plant cell is of practical use in the removal of physical blocks preventing rooting. It teaches that it is possible to discontinue the effect of rooting inhibiting genes. This document suggests that this could be achieved by introducing antisense ipt gene sequences or the gene coding for cytokinin oxydase or cytokinin specific N-glucosyl transferase (p.163, col.1, l.17-26).

By combining the teaching of D1 and D2 the person skilled in the art would elaborate a method, as disclosed in claim 1, **for restoring root formation in a plant in which the rooting was inhibited in a first step.**

Therefore the subject matter of claims 1 is not considered as involving an inventive step under Article 33(3) PCT. In the same way claims 2, 3, 6-9, 13, 14 and 29 which relate to the use of ipt, cytokin and cytokine oxydase are also not considered as involving an inventive step under Article 33(3) PCT.

In the same way, it is obvious that the substances disclosed in table 1A and 1B, the rolABC gene, a repressor of a rooting-inhibiting gene, a mutated cytokin receptor, a degradation enzyme of the rooting inhibiting gene product can be used to achieve the same result. Therefore claims 4, 5, 10-12, 15 and 16 are also not inventive.

As a consequence, the transgenic plants resulting of the application of the method disclosed in said claims and the DNA construct used for their manufacturing are also not considered as involving an inventive step because they result from the use of methods of routine known from the person skilled in the art. Thus claims 17-28 and 30-32 do not meet the requirements of Article 33(3) PCT.

V.3 Industrial applicability

The subject matter of claims 1-32 is industrially applicable according to article 33(4) PCT.

1
EPO - DG 1Enclosure to letter
dated 8-11-2001
PCT/NL00/00597

07. 11. 2001

NEW CLAIMS

(83)

4. Method as claimed in claim 3, characterized
5 in that the substance which inhibits the biosynthesis of
the cytokinin is chosen from a group consisting of the
following analogs of 5-adenosin monophosphate: 8-aza-
adenosin, 1,7 or 9-deazaadenosin, 8-bromo-3-ribosyl, 6-
phenylamino-deoxyadenosin, 7-deaza-adenosin, 8-bromo-
10 adenosin, 8-bromo-adenosin 5'-monophosphate, 3-deaza-
adenosin or the analogs of IPP: aminophenethyl
pyrophosphate, dimethylallyl pyrophosphate.

5. Method as claimed in claim 3, characterized
in that the structural analog of cytokinin is chosen from
15 the following structural analogs of cytokinins: N-(4-
pyridyl)-O-(4-chlorophenyl)-carbamate, 4-
cyclopentylamino-2-methyl-thiopyrrolo[2,3-d]pyrimidine,
various 4-substituted 2-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidines,
including: 4-cyclobutylamino-2-methylpyrrolo[2,3-
20 d]pyrimidine, 4-cyclobutylamino-2-methylpyrrolo[2,3-
d]pyrimidine, 4-cyclopentylamino-2-methylpyrrolo[2,3-
d]pyrimidine, 3-methyl-7-(pentylamino)pyrazolo(4,3-
d)pyrimidine, 3-methyl-7-(benzylamino)pyrazolo(4,3-
d)pyrimidine, 7-(n-pentylamino)-3-(β -D-ribofuranosyl)
25 pyrazololo[4,3-d]pyrimidine, 7-cyclopentylamino-3-(β -D-
ribofuranosyl)pyrazololo[4,3-d]pyrimidine, 7-n-
hexylamino-3-(β -D-ribofuranosyl)pyrazololo[4,3-d]-
pyrimidine, 4-(3-methyl-2-butenylamin)pyrazolo[3,4-
d]pyrimidine-3-carboxamide, 4-(3-methylbutenylamin)
30 pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-3-carboxamide, 4-substituted
triazolo[4,5,d]pyrimidines, 4-substituted pyrazolo(3,4-
d)pyrimidines, 4-substituted triazola(4,5,d)pyrimidines,
4-cyclopentyl-amino-2-methylthiopyrrolo(2,3-d)pyrimidine,
2-cyclobutylamino-4-ethylamino-6-chloro-1,3,5-triazin,
35 alkyl and phenyl N-phenylcarbamates, 4-chloro-2-
cyclobutylamino-6-ethylamino-s-triazin, N-6(phenyl)a-

denine, 1-phenyl-3-(8-quinolinyl)urea, 1-(4-methoxyphenyl)-3-(8-quinolinyl)urea, 1-phenyl-3-((2,6-tetramethyl-4-piperinyl))urea, 1-phenyl-3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidine)-4)urea, 1-phenyl-3-(2-tritylethylamine)-1)urea, 1-phenyl-3-(2-aminoethane)ureum-hydrochlorid, 1-phenyl-3-((1,3,4-thiadiazol)-2)urea, 1-phenyl-3-((1,3-thiazol)-2)urea, 1-(4-methoxyphenyl)-3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidine)-4)urea, 1-phenyl-3-(leucyl)urea, 1-phenyl-3-(8-octanoë)urea, 1-phenyl-3-(pyrazyl)urea, 1-phenyl-3-(2-pyrimidyl)urea, nicotinic acid-N-(leucyl-amid), ((4-methyl)-1-succinic acid)-N-(4-pyridyl)-amide, 1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-pyridyl)urea, benzylaminopurine-N9-propanionic acid, 1-phenyl-3-(glycyl)-urea.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receiving Office use only

PCT/NL 00 / 00597
International Application No.28 AUG. 2000 (28.08.00)
International Filing DateBUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM
P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) L/XQ69/ems/5

Box No. I TITLE OF INVENTION

Conditionele remming van vegetatieve vermeerdering

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Plant Research International
Droevendaalsesteeg 1
6708 PB WAGENINGEN

The Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

--

Facsimile No.

--

Teleprinter No.

--

State (that is, country) of nationality:

The Netherlands

State (that is, country) of residence:

The Netherlands

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☒

all designated States except the United States of America

☐

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

VAN DER KRIEKEN, Wilhelmus Maria
Laantje van Anton Pieck 2
NL-6708 RE WAGENINGEN

The Netherlands

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

The Netherlands

State (that is, country) of residence:

The Netherlands

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

VAN SOMEREN, Petronella Francisca Hendrika Maria
ARNOLD & SIEDSMA
Sweelinckplein 1
NL-2517 GK THE HAGUE
The Netherlands

Telephone No.

+31 70 3654833

Facsimile No.

+31 70 3452140

Teleprinter No.

--

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

VAN LOOKEREN CAMPAGNE, Michiel Maria
Lievestraat 25
B-9920 LOVENDEGEM
Belgium

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
Belgium

State (that is, country) of residence:
Belgium

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KODDE, Jan
Van Doesburglaan 28
NL-6708 MC WAGENINGEN
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
The Netherlands

State (that is, country) of residence:
The Netherlands

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |

Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:



Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM				
<input type="checkbox"/> Further priority claim is indicated in the Supplemental Box.				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) (26.08.99) 26 August 1999	1012917	NL		
item (2)				
item (3)				

☐ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EPO

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4
description (excluding sequence listing part) : 13
claims : 4
abstract : 1
drawings : 1
sequence listing part of description : 1

Total number of sheets : 23

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

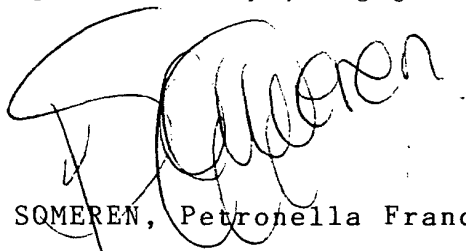
1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☐ other (specify):

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: Dutch

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).



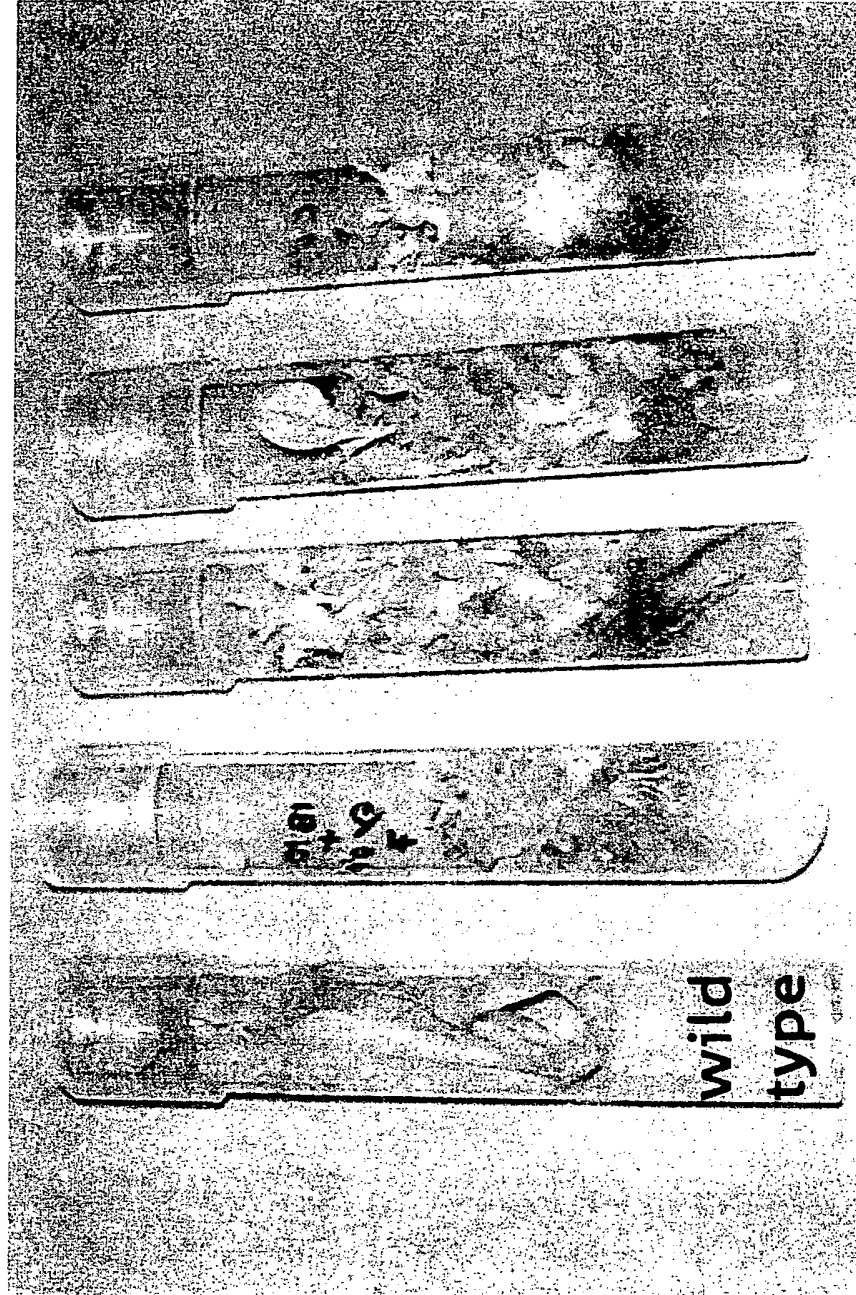
VAN SOMEREN, Petronella Francisca Hendrika Maria

For receiving Office use only		2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	28 AUG. 2000 (28.08.00)	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	06 OCTOBER 2000
	06 OCT 2000

1/1

Rooting of *rolB*-ipt tobacco with 10 μ M IBA plus
anti-cytokinin



CONDITIONELE REMMING VAN VEGETATIEVE VERMEERDERING

De onderhavige uitvinding betreft een werkwijze voor het bewortelen van planten, die zijn beschermd tegen ongewenste vegetatieve vermeerdering, alsmede een DNA construct en een transgene plant, die conditionele
5 remming van vegetatieve vermeerdering mogelijk maken.

Verdelingsbedrijven investeren veel geld bij het maken van nieuwe plantenvariëteiten. Dit geld wordt terugverdiend door de verkoop van de ontwikkelde planten. Hierbij doet zich echter een groot probleem voor doordat
10 de nieuwe variëteiten vaak illegaal via stekken of via enten vermeerderd worden. Zo wordt naar schatting 25 tot 35% van alle verkochte anjers illegaal (dat wil zeggen zonder afdracht van licentievergoedingen) vegetatief vermeerderd. Dit probleem doet zich niet alleen bij anjer
15 voor maar algemeen bij alle siergewassen met een hoge omzet, zoals roos en chrysant, bij potplanten, bij vruchtgroenten, zoals tomaat, meloen, komkommer, paprika, bij monocotyle planten zoals suikerriet en bij houtige gewassen, zoals fruitbomen (bijvoorbeeld appel, peer,
20 kers, sinasappel, perzik, banaan, ananas), laanbomen en bomen voor houtproductie.

De onderhavige uitvinders hebben een technologie ontwikkeld om de wortelvorming conditioneel (onder bepaalde voorwaarden) te remmen. Deze techniek is
25 beschreven in de internationale aanvraag WO99/06579, de inhoud waarvan middels verwijzing hierin wordt opgenomen.

Het werkingsmechanisme behorende bij deze technologie berust op de volgende principes. Bij inductie van wortels aan een scheut (adventieve wortelvorming) en
30 bij zijwortelvorming (laterale wortelvorming) is de plantengroeieregulator auxine betrokken. Auxine komt bij sommige gewassen in voldoende mate voor om wortels aan stekken te induceren en bij sommige andere planten moet het extra, via een stekpoeder (of via een oplossing),
35 toegediend worden.

In de plant bestaan voor deze auxine-

geïnduceerde processen ook antagonisten. Deze antagonisten zijn signaalmoleculen zoals bijvoorbeeld cytokinines en ethyleen. Cytokinines remmen niet alleen beworteling maar kunnen ook entvergroeiing en laterale wortelvorming inhiberen. Uit onderzoek is gebleken dat een zeer kleine hoeveelheid van de cytokinines zeatine of benzylaminopurine toegediend gedurende een korte periode (4 uur) in staat is om in vitro wortelinductie met auxine volledig te blokkeren.

10 Het gen dat codeert voor een eiwit dat een sleutelrol kan vervullen bij de vorming van cytokinine is het isopentenyltransferase gen (ipt-gen) uit Agrobacterium tumefaciens. De omzetting van 5'-adenosinemonofosfaat + isopentenylpyrofosfaat in het
15 cytokinine isopentenyladenine wordt door het enzym isopentenyltransferase gekataliseerd. Dit enzym is aanwezig na transcriptie en translatie van het ipt-gen. Isopentenyladenine wordt in de plant snel omgezet in het zeer actieve cytokinine zeatine. Cytokinine gevormd via
20 het ipt-gen werkt paracrien (op de plaats van synthese) zodat pleiotrope effecten (ongewenste bijeffecten) beperkt zullen zijn.

Andere genen waarmee beworteling of entvergroeiing geremd kan worden zijn genen die celdood
25 induceren op de plaats waar en het moment dat beworteling of entvergroeiing normaalgesproken gewenst zou zijn. Ook regulatie van genen die celdeling sturen (cyclines en cell cycle genen, actine genen, scare crow genen etc.) en genen, die betrokken zijn bij inductie, aanleg en
30 ontwikkeling van adventieve wortelvorming, kunnen gebruikt worden om wortelvorming te remmen (bijvoorbeeld via inhibitie van functionele genexpressie). Verder kunnen genen die een rol spelen bij auxinetransport, zoals de PIN-genen, gebruikt worden voor inhibitie van
35 wortelvorming en entvergroeiing.

Naast het blokkeren van adventieve wortelvorming kunnen de hierboven genoemde genen ook gebruikt worden om wortelvorming te stoppen op het moment

dat het wortelprimordium aangelegd wordt of reeds aangelegd is. Daarbij wordt gebruik gemaakt van een genpromoter die in deze stadia actief is. Er ontstaat dan geen goed functionerend wortelstelsel. Ook remming van
5 laterale wortelvorming met de genen, die hierboven genoemd zijn, en met genen, die betrokken zijn bij inductie en aanleg van laterale wortels, kunnen gebruikt worden om te voorkomen dat een goed wortelstelsel gevormd wordt (deze genen moeten dan onder controle van een
10 promoter staan die specifiek is voor het stadium van laterale wortelvorming).

Een voorbeeld van een gen dat betrokken is bij de biosynthese van de auxine-antagonist cytokinine is het ipt-gen. Het is voor de stek- of entvermeerderde gewassen
15 van groot belang dat de productie van cytokinine plaatsvindt daar waar normaalgesproken wortelvorming of entvergroeïing gewenst is, maar waar dat nu moet worden tegengegaan. Dit kan bijvoorbeeld bereikt worden met een verwondings-geïnduceerde promoter. Doordat cytokinines,
20 die gevormd worden na expressie van het ipt-gen (zoals isopentenyladenine en zeatine) slecht in de plant getransporteerd worden zijn pleiotrope effecten beperkt. Expressie van het ipt-gen in een verwond blad heeft ook weinig nadelige effecten, omdat cytokinine van nature
25 betrokken is bij herstel van wonden.

In principe is het bovenbeschreven systeem zeer goed bruikbaar om ongewenste vegetatieve vermeerdering van planten tegen te gaan. Echter, het voorkomt ook vermeerdering wanneer dat wel gewenst is, zoals door de
30 ontwikkelaar of kweker van de plant zelf of met toestemming van de ontwikkelaar of kweker.

Het is daarom het doel van de onderhavige uitvinding om een werkwijze te verschaffen, waarmee indien dat nodig of gewenst is de remming van de
35 vegetatieve vermeerdering kan worden opgeheven.

Dit wordt door de uitvinding bereikt door een werkwijze voor het mogelijk maken van beworteling of enting van een plant, welke in haar genoom een onder de

regulatie van een induceerbare promoter geplaatst gen bevat, dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product, omvattende het voorafgaand aan het vervaardigen van een stek of ent
5 behandelen van de plant of het na vervaardigen van een stek of ent behandelen van de stek of ent met een stimulus, die:

- a) het effect van het bewortelingsremmend gen opheft; en/of
- 10 b) leidt tot expressie van een eveneens in de plant aanwezig tweede gen dat onder regulatie staat van een induceerbare promoter en het expressieproduct waarvan het effect van het bewortelingsremmend gen
15 opheft.

Op deze wijze wordt ervoor gezorgd dat de bewortelingsremming wordt uitgeschakeld. De stimulus, meestal een stof, die ervoor zorgt dat bewortelingsremming direct of indirect (via inductie van het tweede
20 gen) wordt opgeheven kan door de eigenaar van het plantenras ter beschikking worden gesteld aan diegenen die gerechtigd zijn tot het vegetatief vermeerderen van een geoctrooieerde of door kwekersrecht beschermde, van het bewortelingsremmend mechanisme voorziene plant.

25 De stimulus die het effect van het bewortelingsremmend gen opheft kan gekozen zijn uit stoffen die de biosynthese van het bewortelingsremmend product remmen en structuuranaloga van het bewortelingsremmend product.

30 Bijzonder geschikte bewortelingsremmende stoffen zijn de endogene plantenhormonen cytokinines. Deze kunnen in een plant waarin het bewortelingsremmend mechanisme actief is worden geproduceerd via expressie van het ipt-gen, het product waarvan een sleutelrol
35 speelt in de cytokininebiosynthese.

De stimulus, in het bijzonder stof, die de biosynthese van het cytokinine remt is een stof die een structuuranaloog is van een precursor van een cytokinine,

zoals de substraten van IPT waaruit isopentenyladenine en vervolgens, via andere enzymen, zeatine gemaakt wordt. Voorbeelden zijn weergegeven in Tabel 1A.

Wanneer remming wordt bewerkstelligd via een competitie-mechanisme, kunnen structuuranaloga van het cytokinine worden toegepast. Geschikte voorbeelden hiervan zijn weergegeven in Tabel 1B.

Tabel 1A

10 Structuuranalogen van precursors

Analogen van 5'-adenosinemonofosfaat:

8-aza-adenosine

1,7 of 9)-deazaadenosine

8-bromo-3-ribosyl

15 6-phenylamino-deoxyadenosine

7-deaza-adenosine (tubercidine)

8-bromo-adenosine

8-bromo-adenosine 5'-monofosfaat

3-deaza-adenosine

20

Analogen voor IPP:

aminopfeenethylpyrofosfaat (APP).

dimethylallyl pyrofosfaat

25 Tabel 1B

Anticytokininen (structuuranalogen van cytokininen)

N-(4-pyridyl)-O-(4-chlorofenyl)-carbamaat (PC)

4-cyclopentylamino-2-methylthio-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (CCP)

30 verschillende 4-gesubstitueerde 2-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidines, waaronder:

4-cyclobutylamino-2-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidine (CBP),

4-cyclobutylamino-2-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidine (CBP),

4-cyclopentylamino-2-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidine

35 (CPP),

3-methyl-7-(pentylamino)pyrazolo(4,3-d)pyrimidine,

3-methyl-7-(benzylamino)pyrazolo(4,3-d)pyrimidine,

7-(n-pentylamino)-3-(β-D-ribofuranosyl)pyrazololo

- [4,3-d]pyrimidine,
 7-cyclopentylamino-3-(β -D-ribofuranosyl)pyrazololo
 [4,3-d]pyrimidine,
 7-n-hexylamino-3-(β -D-ribofuranosyl)pyrazololo[4,3-d]-
 5 pyrimidine,
 4-(3-methyl-2-butenylamin)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-3-
 carboxamide
 4-(3-methylbutenylamin)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-3-car-
 boxamide
 10 4-gesubstitueerde triazolo[4,5,d]pyrimidines
 4-gesubstitueerde pyrazolo (3,4-d)pyrimidines
 4-gesubstitueerde triazola(4,5,d)pyrimidines
 4-cyclopentyl-amino-2-methylthiopyrrollo(2,3-d)pyrimidine
 2-cyclobutylamino-4-ethylamino-6-chloro-1,3,5-triazine
 15 alkyl and fenyl N-phenylcarbamaten
 4-chloro-2-cyclobutylamino-6-ethylamino-s-triazine
 N-6(fenyl)adenine
 1-fenyl-3-(8-quinolinyl)ureum
 1-(4-methoxyfenyl)-3-(8-quinolinyl)ureum
 20 1-fenyl-3-((2,6-tetramethyl-)4-piperinyl)ureum
 1-fenyl-3-((2,2-6,6-tetramethylpiperidine)-4)ureum
 1-fenyl-3-((2-tritylethaanmine)-1)ureum
 1-fenyl-3-(2-aminoethaan)ureum-hydrochloride
 1-fenyl-3-((1,3,4-thiadiazool)-2)ureum
 25 1-fenyl-3-((1,3-thiazool)-2)ureum
 1-(4-methoxyfenyl)-3-((2,2-6,6-tetramethylpiperidine)-
 4)ureum
 1-fenyl-3-(leucyl)ureum
 1-fenyl-3-(8-octanoë)ureum
 30 1-fenyl-3-(pyrazyl)ureum
 1-fenyl-3-(2-pyrimidyl)ureum
 nicotinezuur-N-(leucyl-amide)
 ((4-methyl)-1-barnsteenzuur)-N-(4-pyridyl)-amide
 1-(4-methoxyfenyl)-3-(4-pyridyl)ureum
 35 benzylaminopurine-N9-propanoëzuur
 1-fenyl-3-(glycyl)-ureum

Een alternatief mechanisme om bewortelingsremming en remming van entvergroeiing op te heffen gaat via een genetische route. Daartoe dient de plant in zijn genoom een tweede gen te bevatten. Dit gen leidt, zodra
5 het tot expressie komt, tot het opheffen van de bewortelingsremming. Dat kan op verschillende manieren gebeuren.

Zo kan het tweede gen een gen zijn dat codeert voor de antisense versie van het bewortelingsremmend gen.
10 De van de antisense versie van het gen afgeschreven boodschapper vangt het mRNA van de sense versie weg, waardoor geen vertaling naar eiwit plaatsvindt. Het eiwit is de bewortelingsremmer zelf of nodig in de biosynthese daarvan. Nu het product niet langer wordt gevormd, wordt
15 de bewortelingsremming opgeheven.

Het tweede gen codeert bij voorkeur voor een antisense versie van het ipt-gen.

Verder kan het tweede gen een gen zijn dat codeert voor een tweede sense versie van het
20 bewortelingsremmend gen. Hierdoor kan co-suppressie worden bewerkstelligd. Bij voorkeur codeert het tweede gen voor een sense versie van het ipt-gen.

Ook kan het tweede gen een van de rolABC-genen van Agrobacterium rhizogenes zijn. Expressie van de
25 rolABC genen maakt de plant ongevoeliger voor cytokinine.

In een alternatieve uitvoeringsvorm staat het eerste gen onder regulatie van een induceerbare promotor, die gemodificeerd is, bijvoorbeeld een verwonding-induceerbare promotor die expressie van het ipt-gen
30 reguleert. De modificatie zorgt ervoor dat een repressor op de promotor kan aangrijpen. Het tweede gen, waarvan de expressie eveneens induceerbaar is (bijvoorbeeld via een chemische stof of via een andere methode), codeert voor een repressor-eiwit dat expressie van het eerste gen
35 inhibeert. Een voorbeeld hiervan is het GAL4 repressor systeem. Bij voorkeur is dus het bewortelingsremmend gen het ipt-gen, dat onder regulatie staat van bijvoorbeeld een gemodificeerde wond-induceerbare promotor, waarbij de

modificatie zodanig is dat de repressor van het GAL4 regulatiesysteem hierop kan aangrijpen.

Verder kan het tweede gen coderen voor een afbraakenzym van het bewortelingsremmend genproduct. Het
5 bewortelingsremmend genproduct is bij voorkeur cytokinine en het tweede gen codeert dan voor bijvoorbeeld cytokinine-oxidase.

Tenslotte kan het tweede gen een gemuteerd cytokininereceptorgen zijn, waardoor de cytokinine
10 pathway niet kan verlopen en de beworteling conditioneel wordt.

In al deze gevallen is de expressie van het tweede gen induceerbaar (bijvoorbeeld met een chemische verbinding) en kan derhalve op het moment dat beworteling
15 gewenst is door toediening van de inducer worden aangeschakeld. Inductie verloopt via de promoter. Voorbeelden hiervan zijn gen-regulatiesystemen die gebruikmaken van promoters die induceerbaar zijn met bijvoorbeeld ethanol, koperionen (of andere metalen),
20 tetracycline, dexamethason (en andere glucocorticoïdenpromoters), benzothiadiazool, N-(aminocarbonyl)-2-chlorobenzeen-sulfonamide of tebufenozide.

De uitvinding betreft verder een transgene
25 plant, die omkeerbaar beschermd is tegen ongewenste vegetatieve vermeerdering, welke plant in haar genoom een onder de regulatie van een induceerbare eerste promoter geplaatst eerste gen bevat, dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend
30 product, en een onder regulatie van een door middel van een andere stimulus induceerbare tweede promoter geplaatst tweede gen dat codeert voor een product dat het bewortelingsremmende expressieproduct van het eerste gen inactieveert.

35 Verder heeft de uitvinding betrekking op een DNA construct omvattende transcriptie-initiatie-sequenties, waaronder een induceerbare promoter, en

eventueel transcriptieterminatie sequenties werkbaar gekoppeld aan een tweede gen als hierboven gedefinieerd.

Hetzelfde DNA construct kan voordeligerwijs verder een eerste gen omvatten dat codeert voor een
5 bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product voorzien van werkbaar daaraan gekoppelde transcriptie-initiatiesequenties, waaronder een induceerbare promoter, en eventueel transcriptie-terminatiesequenties. Voordeligerwijs is het eerste gen
10 het ipt-gen.

Het tweede gen kan in zowel de transgene plant als het DNA construct alles zijn als hierboven gedefinieerd.

De uitvinding betreft verder een werkwijze voor
15 het omkeren van bewortelingsremming in een stek of aaneengroeien van een wortelstok en bovenstam (entvergroeiing) van een transgene plant als hierboven beschreven, omvattende het met de stimulus van de tweede promoter behandelen van de stek of ent en het op een
20 bewortelingsmedium plaatsen van de stek of ent.

Volgens de uitvinding dient dus steeds een stimulus, meestal een stof, te worden toegediend die ervoor zorgt dat het mechanisme waardoor de remming van de beworteling wordt opgeheven in werking gezet wordt.
25 Voordeligerwijs is in het geval van een stof deze onderdeel van een samenstelling, zoals bijvoorbeeld een stekpoeder of een graftpromoter (stof die aaneengroeien van de ent met de onderstam bevordert), of een oplossing. Beworteling of entvergroeiing is dan slechts mogelijk in
30 de aanwezigheid van dit stekpoeder, de graftpromoter of een oplossing daarvan. Het stekpoeder of graftpromoter (of oplossingen daarvan) kunnen na het maken van de stek of ent toegediend worden. Daarentegen kunnen de planten waarvan de ent of stek gemaakt wordt ook vooraf worden
35 behandeld met de stof ter remming van het effect van het ipt-gen.

Voorbeelden van de stoffen die direct, dus niet via de genetische route, de bewortelingsremming opheffen,

zijn hierboven genoemd. Naast deze stoffen kunnen ook eenvoudig andere cytokinineremmers gevonden worden in het arsenaal van beschikbare stoffen. Het vinden van deze andere stoffen kan door het testen van een groot aantal stoffen, in zogenaamde high throughput screening (HTS) systemen. In de HTS systemen kunnen vele duizenden verbindingen getest worden. Het IPT-eiwit (of bacterieën die het IPT-eiwit bevatten of produceren) wordt gecombineerd met cytokinineprecursors (5'-adenosinemono- fosfaat en isopentenylpyrofosfaat) en te testen potentiële inhibitors. Nagegaan wordt vervolgens, met bijvoorbeeld gaschromatograaf-massaspectrograaf (GC-MS) of met antilichamen in een ELISA of RIA test, of isopentenyladenine (IP) of zeatine gevormd is. De effectiviteit van de stoffen die de IP- of zeatinevorming remmen kan via zogeheten "combinatorial chemistry" verder geoptimaliseerd worden. Dit alles kan leiden tot de identificatie van stoffen die geschikt zijn voor directe toepassing om de ipt-werking in de plant weer ongedaan te maken (conditionele inhibitie van beworteling).

De werking van het genetische mechanisme waarmee bewortelingsremming wordt opgeheven is gebaseerd op expressie-inductie. Het tweede gen dat de werking van het bewortelingsremmend product opheft wordt op het gewenste moment aangeschakeld door inductie via zijn promoter. Induceerbare promoters zijn bijvoorbeeld de op zich bekende met behulp van alcohol en tetracycline induceerbare systemen. Andere voorbeelden van inducers zijn, koperionen (of andere metalen), dexamethason (en andere glucocorticoïde promoters), benzothiadiazool, N-(aminocarbonyl)-2-chlorobenzeensulfonamide of tebufenozide.

Het is verder mogelijk de DNA constructen, die het bewortelingremmend gen en/of het gen dat leidt tot opheffing van de bewortelingsremming, van een merker gen te voorzien, zoals GUS of GFP. Er kan dan door de hele keten heen - van producent tot consument - een zeer snelle toets worden uitgevoerd op de aanwezigheid van de

reporter, zoals door middel van een GUS assay of met behulp van een fluorescentiemeter. Via een Southern blot of PCR reactie kan het construct dat is ingebouwd worden geïdentificeerd.

5 In de onderhavige aanvraag wordt onder "bewortelingsremmend gen" verstaan een gen dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product of een gen dat codeert voor een product dat entvergroeiing kan voorkomen of leidt tot het
10 voorkomen van entvergroeiing. Het genproduct van het bewortelingsremmend gen wordt "bewortelingsremmend genproduct" genoemd. Dit product is niet noodzakelijkerwijs zelf bewortelingsremmend, maar leidt in elk geval tot remming van de beworteling of tot het
15 voorkomen van entvergroeiing.

De onderhavige uitvinding zal verder worden geïllustreerd aan de hand van het hierna volgende voorbeeld dat slechts ter verduidelijking is gegeven, maar niet als beperkend dient te worden gezien.

20

VOORBEELD

Conditionele wortelvorming door toepassing van anti-cytokinine op plantenweefsels die het ipt-gen tot expressie brengen

25 In dit voorbeeld wordt het in vitro effect bekeken van anti-cytokinine op auxine-geïnduceerde wortelinductie op transgene tabaksplanten (cultivar SR1), die het ipt-gen achter de rolB promoter in zich dragen.

Eerst werd aangetoond dat de rolB promoter
30 aangeschakeld wordt door auxine. Dit werd gevonden in experimenten met groepen tabaksplanten (cultivar SR1, verkrijgbaar in de reguliere zaadhandel) die met verschillende genconstructen getransformeerd zijn. Deze planten werden getransformeerd met de rolB promoter, die
35 ofwel het glucuronidase (GUS)- of het rolB gen (dat wil zeggen dat de rolB promoter voor het rolB gen staat) reguleerde. Stengelschijven van de rolB-rolB en rolB-GUS scheuten werden in vitro geïncubeerd op bewortelings-

medium zonder auxine of op bewortelingsmedium met
verschillende concentraties van de auxines indol-3
boterzuur (IBA) of indol-3-azijnzuur (IAA). De rolB-GUS
scheuten vertoonden een toename in GUS-expressie in de
5 GUS-assay na incubatie gedurende verschillende periodes
op auxinebevattend medium (in vergelijking met scheutjes
geïncubeerd op medium zonder auxine).

Hiermee in overeenstemming werd aangetoond op
een Northern blot, die gemaakt werd van rolB-rolB
10 stengelschijven van tabak, dat auxine de expressie van
het rolB gen induceerde. Tenslotte resulteerde in rolB-
ipt SR1 tabaksweeftsel, expressie van het ipt-gen in een
zeer sterke toename in de vorming axillaire scheuten
(tussen de tien en twintig ten opzichte van de controle
15 planten die geen axillaire scheuten vormden), hetgeen
wijst op een verhoogd cytokininegehalte via expressie van
het ipt-gen.

Deze transgene rolB-ipt tabaksscheuten werden
in twintigvoud gedurende drie weken geïncubeerd op
20 Murashige en Skoog medium met 2% sucrose en de auxines
indol-3-boterzuur (IBA) of naphthaleen azijnzuur (NAA).
De auxines waren gedurende de gehele incubatieperiode
aanwezig in de volgende concentraties: 0, 1, 3.2, 10 and
100 μ M. Als controle werden de zelfde incubaties
25 uitgevoerd met wildtype SR1 tabaksscheuten. De transgene
tabaksplanten vormden geen wortels. De wildtype controle
scheuten vormden wortels bij alle auxineconcentraties.
Bij 100 μ M auxine werd sterke callusvorming waargenomen.

De rolB-ipt SR1 tabaksscheuten werden
30 geïncubeerd met 10 μ M IBA plus 10 of 100 μ M van het anti-
cytokinine 2-cyclobutylamino-4-ethylamino-6-chloro-1,3,5-
triazine. Deze scheuten (zie figuur) waren in staat
wortels te vormen in tegenstelling tot de scheuten die
zonder anti-cytokinine werden geïncubeerd. Dit toont aan
35 dat het effect van expressie van het ipt-gen tegengegaan
kan worden door anti-cytokinines. Andere anti-cytokinines
staan vermeld in Tabel 1B.

Anti-cytokinine werking kan eveneens verkregen worden via introductie van een genconstruct dat het effect van expressie van het ipt-gen tegengaat, zoals in de beschrijvingsinleiding is uitgelegd.

5 De voor bovengenoemde experimenten gebruikte technieken zijn beschreven in de volgende referenties:

1. Het snijden van stengelschijven, incubatiemethoden en in vitro technieken: Van der Krieken WM, Breteler H, Visser MHM, Mavridou D. 1993. The role of the
10 conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. Plant Cell Reports 12, 203-206.
2. Het bewortelingsmedium: Quoirin M, Lepoivre P, Boxus P. 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches
15 sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux. In Comptes Rendus de Recherches 1976-1977 de la Station des Cultures Fruitieres et Maraicheres. Gembloux, Belgium, 93-117.
- 20 3. Het MS medium: Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.



CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het mogelijk maken van
beworteling of enting van een plant, welke in haar genoom
een onder de regulatie van een induceerbare promoter
geplaatst gen bevat, dat codeert voor een
5 bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend
product, omvattende het voorafgaand aan het vervaardigen
van een stek of ent behandelen van de plant of het na
vervaardigen van een stek of ent behandelen van de stek
of ent met een stof, die:
- 10 a) het effect van het bewortelingsremmend gen
opheft; en/of
- b) leidt tot expressie van een eveneens in de
plant aanwezig tweede gen dat onder regulatie staat van
een induceerbare promoter en het expressieproduct waarvan
15 het effect van het bewortelingsremmend gen opheft.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het
kenmerk**, dat de stof die het effect van het
bewortelingsremmend gen opheft gekozen is uit de groep
die bestaat uit stoffen die de biosynthese van het
20 bewortelingsremmend product remmen en structuuranaloga
van het bewortelingsremmend product.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, **met het
kenmerk**, dat het bewortelingsremmend product een
cytokinine is.
- 25 4. Werkwijze volgens conclusie 3, **met het
kenmerk**, dat de stof die de biosynthese van het
cytokinine remt is gekozen uit de groep die bestaat uit
stoffen uit Tabel 1A.
5. Werkwijze volgens conclusie 3, **met het
30 kenmerk**, dat het structuuranaloon van cytokinine is
gekozen uit de groep die bestaat uit stoffen uit Tabel
1B.
6. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het
kenmerk**, dat het tweede gen een gen is dat codeert voor
35 de antisense versie van het bewortelingsremmend gen.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een antisense versie van het ipt-gen.

8. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het tweede gen een gen is dat codeert voor een tweede sense versie van het bewortelingsremmend gen.

9. Werkwijze volgens 8, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een sense versie van het ipt-gen.

10. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het tweede gen een of meer van de rolABC-genen van Agrobacterium rhizogenes is.

11. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een repressor van de promoter van het bewortelingsremmend gen.

12. Werkwijze volgens conclusie 11, **met het kenmerk**, dat het bewortelingsremmend gen het ipt-gen is en onder regulatie staat van staat van een gemodificeerde wond-induceerbare promoter, waarbij de modificatie zodanig is dat de repressor van het GAL4 regulatiesysteem hierop kan aangrijpen.

13. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een afbraakenzym van het bewortelingsremmend genproduct.

14. Werkwijze volgens conclusie 13, **met het kenmerk**, dat het bewortelingsremmend genproduct cytokinine is en het tweede gen codeert voor cytokinine-oxidase.

15. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een gemuteerde receptor voor het bewortelingsremmend genproduct teneinde de signaaltransductie pathway van het bewortelingsremmend genproduct te blokkeren.

16. Werkwijze volgens conclusie 15, **met het kenmerk**, dat het bewortelingsremmend genproduct cytokinine is en het tweede gen codeert voor een gemuteerde cytokinine-receptor.

17. Transgene plant, die omkeerbaar beschermd is tegen ongewenste vegetatieve vermeerdering, welke plant in haar genoom een onder de regulatie van een induceerbare eerste promoter geplaatst eerste gen bevat, 5dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product, en een onder regulatie van een door middel van een andere stimulus induceerbare tweede promoter geplaatst tweede gen dat codeert voor een product dat het bewortelingsremmende 10expressieproduct van het eerste gen inactieveert.

18. Transgene plant volgens conclusie 17, **met het kenmerk**, dat het tweede gen een gen is dat codeert voor de antisense versie van het bewortelingsremmend gen.

19. Transgene plant volgens 18, **met het** 15**kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een antisense versie van het ipt-gen.

20. Transgene plant volgens conclusie 17, **met het kenmerk**, dat het tweede gen een gen is dat codeert voor een tweede sense versie van het bewortelingsremmend 20gen.

21. Transgene plant volgens conclusie 20, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een sense versie van het ipt-gen.

22. Transgene plant volgens conclusie 17, **met** 25**het kenmerk**, dat het tweede gen een of meer van de rol-ABC-genen van Agrobacterium rhizogenes is.

23. Transgene plant volgens conclusie 17, **met het kenmerk**, dat het tweede gen codeert voor een repressor van de promoter van het bewortelingsremmend 30gen.

24. Werkwijze volgens conclusie 23, **met het kenmerk**, dat het bewortelingsremmend gen het ipt-gen is en onder regulatie staat van een gemodificeerde wond-induceerbare promoter, waarbij de modificatie zodanig is 35dat de repressor van het GAL4 regulatie systeem hierop kan aangrijpen.

25. Transgene plant volgens conclusie 17, met het kenmerk, dat het tweede gen codeert voor een afbraakenzym van het bewortelingsremmend genproduct.

26. Transgene plant volgens conclusie 25, met het kenmerk, dat het bewortelingsremmend genproduct cytokinine is en het tweede gen codeert voor cytokinine-oxidase.

27. Transgene plant volgens conclusie 17, met het kenmerk, dat het tweede gen codeert voor een gemuteerde receptor voor het bewortelingsremmend genproduct teneinde de signaaltransductie pathway van het bewortelingsremmend genproduct te blokkeren.

28. Transgene plant volgens conclusie 27, met het kenmerk, dat het bewortelingsremmend genproduct cytokinine is en het tweede gen codeert voor een gemuteerde cytokinine-receptor.

29. Werkwijze voor het omkeren van bewortelingsremming in een stek of ent van een transgene plant volgens conclusie 17-28, omvattende het met de stimulus van de tweede promotor behandelen van de stek of ent en het op een bewortelingsmedium plaatsen van de stek of ent.

30. DNA construct omvattende transcriptie-initiatiesequenties, waaronder een induceerbare promotor, en eventueel transcriptieterminatie sequenties werkbaar gekoppeld aan een tweede gen als gedefinieerd in het kenmerk van conclusies 6-16.

31. DNA construct volgens conclusie 30, verder omvattende een eerste gen dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product voorzien van werkbaar daaraan gekoppelde transcriptie-initiatiesequenties, waaronder een induceerbare promotor, en eventueel transcriptieterminatie sequenties.

32. DNA construct volgens conclusie 31, met het kenmerk, dat het eerste gen het ipt-gen is.



UITTREKSEL

De uitvinding betreft een werkwijze voor het mogelijk maken van beworteling of enting van een plant, welke in haar genoom een onder de regulatie van een induceerbare promoter geplaatst gen bevat, dat codeert voor een bewortelingsremmend of tot bewortelingsremming leidend product, omvattende het voorafgaand aan het vervaardigen van een stek of ent behandelen van de plant of het na vervaardigen van een stek of ent behandelen van de stek of ent met een stof, die ofwel het effect van het bewortelingsremmend gen opheft; en/of leidt tot expressie van een eveneens in de plant aanwezig tweede gen dat onder regulatie staat van een induceerbare promoter en het expressieproduct waarvan het effect van het bewortelingsremmend gen opheft. De uitvinding betreft verder een transgene plant, die voorzien is van een mechanisme voor het bewortelingsremming en een mechanisme dat bewortelingsremming opheft, en een DNA construct voor het bewerkstelligen van opheffing van bewortelingsremming.